

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-067218

(43)Date of publication of application : 07.03.1990

(51)Int.Cl.

A61K 31/35
A61K 31/045
A61K 31/56
A61K 31/70
// A61K 35/78
C07C 35/44
C07D311/36

(21)Application number : 63-217427

(71)Applicant : NAGAKURA SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 31.08.1988

(72)Inventor : KIJIMA TAKAO

TOKUDA HARUKUNI

KOZUKA MUTSUO

TANABE MASAHIRO

(54) VIRUS GENOME INACTIVATOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a virus.genome inactivator containing a specific compound, such as afromosin or formononetin, as an active ingredient and effective in antiviral, carcinostatic use and preventing cancer.

CONSTITUTION: A virus.genome inactivator containing one or two or more of compounds, expressed by formula

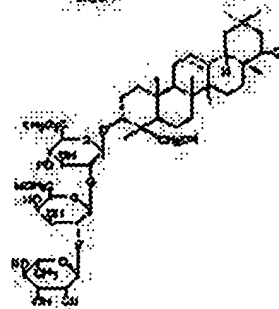
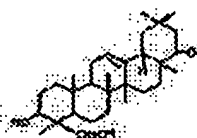
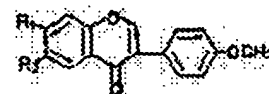
I, i.e., afromosin (R1 is OH; R2 is OCH3), formononetin (R1 is OH; R2 is H), ononin (R1 is O-glucose; R2 is H), wistin (R1 is O-glucose; R2 is OCH3), 7-O-acetyl-formononetin (R1 is O-acetyl; R2 is H) and 7-O-acetylafromosin (R1 is O-acetyl; R2 is OCH3),

soyasapogenol B expressed by formula II and

soyasapogenin I expressed by formula III and obtained

from a plant belonging to the genus Wistaria as an active

ingredient. The above-mentioned compounds are capable of remarkably inhibiting expressing of EB virus.genome by tetradecanoylphorbol acetate.



⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平2-67218

⑫ Int. Cl.³

A 61 K 31/35
31/045
31/58
31/70

識別記号

ADY

ADU

庁内整理番号

7475-4C
7330-4C
7375-4C
7431-4C※

⑬ 公開 平成2年(1990)3月7日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 ウイルス・ゲノム不活化剤

⑮ 特 願 昭63-217427

⑯ 出 願 昭63(1988)8月31日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月10日、社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第108年会報
摘要集」に発表

⑰ 発 明 者 木 島 孝 夫 京都府京都市中京区三条通宣町東入御倉町63番地
⑱ 発 明 者 徳 田 春 邦 京都府京都市左京区下鴨北園町3番地
⑲ 発 明 者 小 塚 睦 夫 京都府京都市上京区上御薗中町458番地
⑳ 発 明 者 田 部 昌 弘 大阪府大阪市西成区聖天下1丁目7-16 長倉製薬株式会
社内
㉑ 出 願 人 長倉製薬株式会社 大阪府大阪市南区日本橋1丁目17番17号
㉒ 代 理 人 弁理士 青 山 蓑 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ウイルス・ゲノム不活化剤

2. 特許請求の範囲

アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、
ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニン
1、7-0-アセチル-フォルモノネチンおよび
7-0-アセチル-アフロモシンの一種または二
種以上を有効成分とする、ウイルス・ゲノム不活
化剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、ウイルス・ゲノム不活化剤に関す
るものである。このような薬剤は、発癌プロモ
ーター阻害剤として癌の治療に、およびウイルス病
の治療に有用である。

〔従来の技術および発明が解決しようとする課題〕

発癌には刺激または発癌としての項数が必要
に俾うものであるという考え方に基づいて、発癌
二段階実験が行われた。それ以来、発癌機構にお

いて、長期間の作用を要する二段階目のプロモ
ーション(促進効果)が重要な過程として取上げられ、
現在、その研究が中絶に進められている。ヒトの
生活に因与する物質中には、さまざまな発癌プロ
モーター物質が存在するとともに、さまざまな抗
発癌プロモーター物質も存在し、これらの物質は
ヒトの発癌に関連する重要な要因となっている。
抗発癌プロモーターとしては、生体中に活性成分
の存在が認められることが次第に明らかになって
きているが、まだその有効性を分析した例は少な
く、その解析およびそれに基づく新たな薬剤の開
発が望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

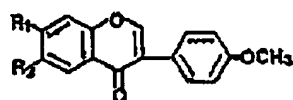
本発明者等は、発癌プロモーターがウイルス活
性化剤と置換するところから、アフリカに多発する
バーネット(Burkitt)・リンパ腫由来のエプス
タイン・バーン・ウィルス(Epstein Barr virus、
以下EBウィルスと略称)を含むが、EBウィ
ルス非産生のリンパ腫細胞株細胞であるラジ
Raji細胞にプロモーターとしてチトラダカノイ

メルボルン・アルセチート(以下、T P Aと略称)を作用させることによりB Dウィルスを活性化する品を用いて、落葉植物中に含まれるB Dウィルス活性化抑制物質を検索したところ、フジ科に属する植物の抽出物から得られるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、リヤサボゲノールBおよびソヤサポニン¹がT P AによりB Dウィルス活性化を顕著に抑制することを見出した。さらに、本発明者等は、これらに類縁する化合物について同様な検索を行ったところ、7-0-アセチル-フォルモノネチンおよび7-0-アセチル-アフロモシンが同様な抑制作用を有することを見出した。

〔発明の構成〕

本発明は、アフロセシン、ファルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサバゲノールB、ソヤサバニリン、7-O-アセチル-ファルモノネチン、および7-O-アセチル-アフロセシンの一種または二種以上を有効成分として含有するウィルス-ゲノム不活化剤を提供するものである。

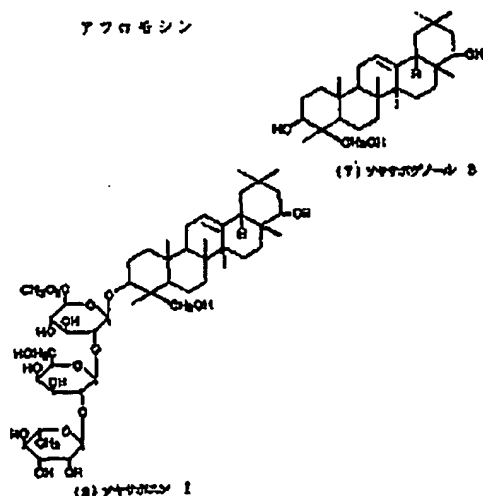
本発明の有効成分であるアフロモシジ(1)、フ
ルモノネチン(2)、オノニン(3)、ウィスチン(4
)、7-0-アセチル-フルモノネチン(5)、
7-0-アセチル-アフロモシジ(6)、ソヤサボ
ゲノールB(7)、ソヤサボニン(8)は協記の式
に示した構造を有する公知の化合物であり、文献
ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブ
レタン(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)
11巻882頁(1963年)、薬学雑誌56巻1
388頁(1975年)、ケミカル・アンド・ファ
ーマシューティカル・ブレタン(Chemical and
Pharmaceutical Bulletin)24巻121頁(19
76年)およびケミカル・アンド・ファーマシュー
ティカル・ブレタン(Chemical and Pharmaceu
tical Bulletin)30巻2294頁(1982年)
に記載されている。



これらの有効成分を含有する植物としては、フジ (*Nisleria floribunda*)、ヤマフグ (*Nisleria brachybotrys*)、シナフジ (*Nisleria sinensis*)等が知られている。これらの有効成分の上記植物からの抽出製造は公知の常規抽出法や圧搾、蒸餾、再結晶、同沈殿、各種クロマトグラフィー等の組み合わせによって達成することができる。その一例を示すと次の通りである。

例えば、ヤマフジ (*Wisteria brachybotrys*) の樹および根をメタノールで加温 (60~75℃) 抽出し、得られる抽出液をクロロホルムと水、 n -BuOH と水で順次分配し、クロロホルム抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/メタノールの混合溶媒で溶出してくるフラクションの凝縮物をメタノール/水から分別再結晶すると、アフロセリン、ソヤサボゲノール B、ウォルモノネチン、ウィスチンが得られる。さらに、 n -BuOH 抽出物をカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーに付すと、オノニン、ソヤサボニン I が得られる。

	R ₁	R ₂
(1) アフロキシシン	-OH	-OCH ₃
(2) フェルモノネチン	-OH	-H
(3) オノニン	-O-β-D-グルコース	-H
(4) ウィステシン	-O-β-D-グルコース	-OCH ₃
(5) 7-O-アセチル- フェルモノネチン	-O-7位アセチル	-H
(6) 7-O-アセチル- アフロキシシン	-O-7位アセチル	-OCH ₃



このようにして得られる上記成分の物性値を下記に示す。

アフロモシンの物性値

分子式: $C_{17}H_{14}O_8$

EI-MS: 298 (M^+)

UV(EtOH): 2319, 259, 286 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

8173.9, 158.5, 152.6,
152.5, 151.4, 146.6, 129.7,
124.2, 122.3, 116.0, 113.3,
104.4, 102.6, 55.6, 55.0 ppm.

フォルモノネチンの物性値

分子式: $C_{16}H_{12}O_8$

EI-MS: 268 (M^+)

UV(EtOH): 2301, 249, 267 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

8174.8, 158.5, 162.7,
159.1, 157.6, 163.1, 180.2,
127.6, 124.4, 123.4, 116.9,
116.3, 113.7, 102.2, 56.3 ppm.

ppm.

リヤサボゲノールBの物性値

分子式: $C_{20}H_{16}O_8$

EI-MS: 458 (M^+), 440, 288

^{13}C -NMR(Pyridine- D_5):

8144.8, 122.2, 80.0, 75.4,
64.5, 66.3, 48.1, 46.8, 45.3,
48.1, 42.3, 40.0, 38.9, 38.0,
37.0, 33.5, 33.2, 30.9, 28.6,
28.4, 26.4, 25.7, 24.1, 23.8,
21.2, 19.1, 17.1, 16.3 ppm.

リヤサボニンIの物性値

分子式: $C_{20}H_{16}O_{10}$

比旋光度: -8.8° ($C=1.0$, MeOH)

^{13}C -NMR(Pyridine- D_5):

8170.4, 144.9, 122.4, 105.
5, 102.5, 101.8, 91.3, 78.2,
77.8, 77.0, 76.8, 74.4, 73.6,
72.8, 72.7, 72.4, 71.2, 69.4,
68.6, 61.6, 56.1, 47.8, 46.8,

フィスチンの物性値

分子式: $C_{17}H_{14}O_{10}$

UV(EtOH): 2320, 280 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

8173.9, 158.6, 153.0,
151.2, 150.9, 147.2, 129.8,
124.0, 122.5, 117.5, 113.4,
104.5, 103.2, 99.4, 77.0, 72.
8, 69.4, 78.5, 60.5, 55.7, 55.
9 ppm.

オノニンの物性値

分子式: $C_{20}H_{16}O_8$

UV(EtOH): 2301, 259, 233, 2
11 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

8174.3, 161.1, 158.7,
166.7, 163.8, 129.8, 126.7,
123.7, 123.1, 118.2, 115.3,
113.3, 103.2, 99.7, 77.0,
72.9, 69.4, 76.8, 60.5, 55.0 p

45.3, 43.9, 42.4, 42.3, 39.9,
38.6, 38.0, 36.5, 33.3, 30.9,
28.7, 26.7, 26.5, 25.7, 24.1,
23.0, 21.2, 18.9, 18.6, 16.6
9, 15.8 ppm.

また、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンは、各々アフロモシンならびにフォルモノネチンを用いられるアセチル化剤、例えば無水酢酸またはアセチルクロリド、好ましくは無水酢酸/ピリジン混液で処理することによって得られ、その物性値は下記の通りである。

7-O-アセチル-アフロモシンの物性値

分子式: $C_{19}H_{16}O_8$

EI-MS: (M^+), 298

1H -NMR(CDCl $_3$):

8.2.37(3H,s), 3.85(3H,s), 3.9
4(3H,s), 6.99(2H,d), 7.24(1H,s),
7.50(2H,d), 7.76(1H,s), 7.79(1
H,s).

7-O-アセチル-フォルモノネチンの物性値分子式: $C_{10}H_{11}O_2$ EIMS: 916 (M^+), 268 1H -NMR($CDCl_3$):

δ 2.96 (3H, s), 3.88 (3H, s), 6.98 (2H, d), 7.16 (1H, dd), 7.29 (1H, d), 7.50 (2H, d), 7.98 (1H, s), 8.31 (1H, d).

この発明において、有効成分アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-フォルモノネチンおよび7-O-アセチル-アフロモシンは、これを単独で使用することもでき、また二種以上を併用することもできる。併用する場合、相乗作用が見られることがある。併用に際しては、植物から抽出分離した個々の化合物または個々のアセチル化合物を混合してもよく、抽出精製過程で用いられた二種以上の化合物の混合物、アフロモシンとフォルモノネチンの混合アセチル化合物、またはこれらの混合物を用いてもよい。

もしくは錠体の堅固製剤用型体を用いて公知の方法で製造することができる。錠体としては、例えばデンプン、乳糖、ぶどう糖、しょ糖、デキストリン、セルロースおよびその誘導体、パラフィン、脂肪酸グリセリド、水、アルコール等が用いられる。また、製剤には他の有効成分、補助剤、安定剤、乳化剤、崩壊剤、結合剤、崩壊剤等の常用添加剤を含ませることができる。

上記のように、本発明で用いるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンは、EBウイルス・ゲノムの発現を阻害することから、抗ウイルス剤およびがん剤としての利用が考えられる。

さらに、TPAのような発癌プロモーターの作用を阻害する面は癌の予防にも効果が期待できることを示しており、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-ア

ウィルス・ゲノム不活化およびそれに続く抗癌、抗ウイルス作用を目的とする上記化合物の投与量は、勿論投与の目的、患者の年齢、状態、症状の重さ等によって異なるが、一般に目的とする作用を発揮するに十分な有効成分の濃度をもたらす量であり、これは通常10~1000μg/kgである。哺乳動物に投与する場合、通常20~6000mgを1日2~4回の分割投与または持続性製剤として投与する。なお、上記化合物をマウスに投与した場合顕著な毒性が見られなかった。

投与に際しては、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-アフロモシン、7-O-アセチル-フォルモノネチンの有効成分と非毒性成分を含有する組成物(製剤)の形で医薬品として用いることができる。このような製剤には、例えば経口剤として、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、顆粒剤、散剤等の固体制剤または水剤、シロップ等の液剤製剤が含まれる。これら各種の製剤は慣用の処方もしくは有標のまたは固体制

剤および7-O-アセチル-フォルモノネチンを有効成分とする癌予防薬や医薬品としての応用も可能である。

上記EBウイルス・ゲノムの発現阻害作用は、例えば、前述のラジ(Raji)細胞培養系に発癌プロモーターであるTPAと癌細胞発現のために相乗作用として働くα-胎盤、それに被験物質を加え培養し、TPAにより活性化されて細胞表面に発現されるEBV-EA(EBウイルス・早期抗原)を上咽頭癌患者由来の抗体を用いる間接免疫法で検出することからなる方法により、阻害することができる。また、この発明で用いる化合物はパピロマウイルスに対しても効果を示す。

次に、この発明で用いる化合物のEBウイルス・ゲノム発現阻害活性について実施例により説明する。

【実施例1】

細胞を継代、維持するための培養液として、RPMI 1640の培養液に牛血清とペニシリン、ストレプトマイシンの既知濃度を加えたものを使

特開平2-67218 (5)

用し、その培養液にてラジ(Raji)細胞を37℃の条件下で培養した細胞を検査用の指示細胞とした。この細胞を培養培地中で 1×10^4 細胞/mlの濃度にした後、4 mMのp-酪酸、20 ng/mlのTPAを加え、それに接種物質を反応させて、37℃で48時間、炭酸ガス下で培養を行った。反応後、上咽頭癌患者血清を使用した抗原抗体反応によりBBV-EAを間接免疫法により検出し、その陽性細胞の発現をTPAの値を加えた対照と比較し、その割合について検討したところ、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンIはそれぞれ抑制率が、88.7%、89.7%、29.8%、21.5%、76.2%、62.5%であった。また同時に行った細胞生存率は78%以上で、細胞毒性は認められない。この結果を第1図に示す。

さらに、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンについても同様を試験したところ、その抑制率が、73.0%、66.6%また細胞生存率については、7

0%以上であった。この結果を第2図に示す。

さらに、これら化合物を、任意の割合で混ぜ合わせることによる、相乗効果の有無性についての評価を行ったところ、その一例として、フォルモノネチンのみでは抑制率が89.7%であったが、フォルモノネチンにアフロモシンを混合した場合、それに、オノニン、ウィスチンをそれぞれ混合した試料での抑制率はそれぞれ89.7%、69.4%、74.0%、95.1%の値を示し、各試料を同時に使用することの有効性が認められた。この結果を第3図に示す。

〔発明の効果〕

以上のように本発明で用いるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンIならびに7-O-アセチル-フォルモノネチン、7-O-アセチル-アフロモシンの一種または二種以上の混合物は、TPAによるBBV-EAの発現を顕著に阻害することから、ウィルス・ゲノムの不活性化剤として使用することができ、抗ウィルス、制がん、がん

予防の目的で医薬製剤としてまたは食品に混合して使用することが可能である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1において、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールBおよびソヤサボニンIの濃度に対するBBVウィルス・ゲノムの発現阻害活性を示すグラフであり、横軸はTPAに対するアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールBまたはソヤサボニンIのモル比を、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

第2図は、実施例1において、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンの濃度に対するBBVウィルス・ゲノムの発現阻害活性を示すグラフであり、横軸はTPAに対する7-O-アセチル-アフロモシンまたは7-O-アセチル-フォルモノネチンのモル比を、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

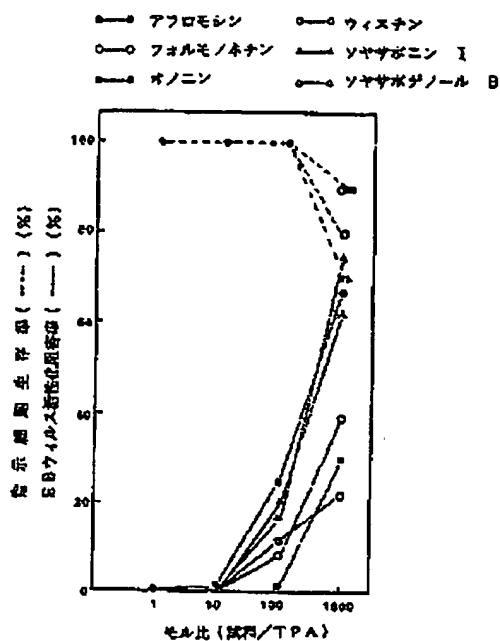
第3図は、実施例1において、二種以上の化合物を併用した場合の結果を示すグラフであり、横

軸はTPAに対する化合物のモル比、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

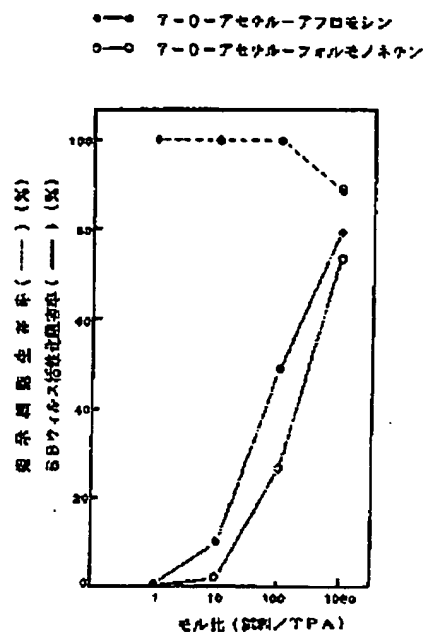
特許出願人 長倉製薬株式会社

代 理 人 弁 理 士 野 山 根 ほか1名

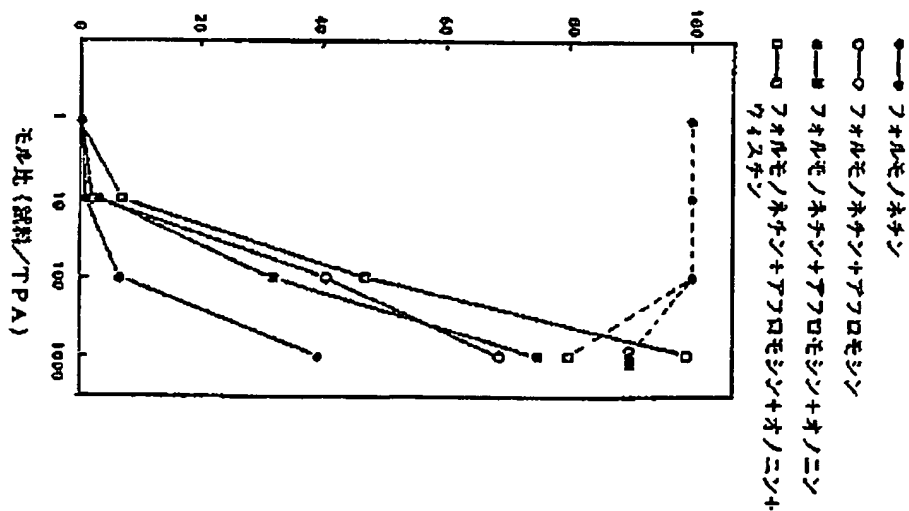
第1図



第2図



指示細胞生存率 (---) (%)
EBウイルス活性化阻害率 (—) (%)



第3図

特開平2-87218 (7)

第1頁の続き

④Int. Cl. 5

A 61 K 35/78
C 07 C 35/44
C 07 D 311/38

識別記号

J

庁内整理番号

8413-4C